

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1941

THESE

N°

194

POUR

LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(MENTION MÉDECINE)

par

Nelicia MAYER

Née le 26 juin 1904, à Ivanesti (Roumanie).

CONTRIBUTION A L'ETUDE

DE LA

GLYCOLYSE

Président : M. Léon BINET, Professeur

PARIS

IMPRIMERIE R. FOULON

29, Rue Deparcleux, 29

1941

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1941

THESE

N°

POUR

LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(MENTION MÉDECINE)

par

Nélicia MAYER

Née le 26 Juin 1904, à Ivanesti (Roumanie).

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA
GLYCOLYSE

Président : M. Léon BINET, Professeur

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, Rue Deparcieux, 29
1941



LE DOYEN... BAUDOUIN

I. — PROFESSEURS

Anatomie	ROUVIERE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	POLONOVSKI
Bactériologie	Robert DEBRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN
Pathologie médicale	PASTEUR-VALLERY- RADOT.
Pathologie chirurgicale	MONDOR.
Anatomie pathologique	LEROUX.
Histologie	CHÂMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	AUBERTIN.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LEVY-VALENSI.
Pathologie expérimentale et comparée	Henri BENARD.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	CHIRAY.
Clinique médicale	{ ABRAMI.
	{ FIESSINGER.
	{ LOEPER.
	{ RATHERY.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBECOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	LAIGNEL-LAVASTINE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
Clinique chirurgicale	{ CUNEO.
	{ GOSSET.
	{ GREGOIRE.
	{ LENORMANT.
Clinique ophtalmologique	VELTER.
Clinique urologique	CHEVASSU.
Clinique d'accouchements	{ COUVELAIRE.
	{ JEANNIN.
Clinique gynécologique	LEVY-SOLAL.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	MOCQUOT.
Clinique thérapeutique médicale	OMBREDANNE.
Clinique oto-rhino-laryngologique	HARVIER.
Clinique thérapeutique chirurgicale	LEMAITRE.
Clinique propédeutique	Pierre Duval.
Clinique de la Tuberculose	M. VILLARET.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte ..	TROISIER.
Clinique de cardiologie	MATHIEU.
Clinique de neuro-chirurgie	LAUBRY.
Assistance Médico-sociale	Clovis VINCENT.
	N...
Professeurs sans chaire	{ HAZARD.
	{ MULON.
	{ OLIVIER.
	{ SANNIE.
	{ VERNE.

II. — AGREGES EN EXERCICE

MM.

AMELINE		Pathologie chirurgicale.
BARIETY		Pathologie médicale.
BERNARD (Etienne).		Pathologie médicale.
BESANÇON (Justin).		Hydrologie.
BONNET		Bactériologie.
BOULANGER		Chimie.
BOULIN		Pathologie médicale.
BROUET		Pathologie médicale.
BULLIARD		Histologie.
CACHERA		Pathologie médicale.
CORDIER		Anatomie.
COSTE		Pathologie médicale.
COUVELAIRE (Roger).		Urologie.
DELARUE		Anatomie pathologique.
DELAY		Pathologie médicale.
DEGREZ (H.)		Physique.
DESOILLE		Médecine légale.
DIGONNET		Obstétrique.
DOGNON		Physique.
FEVRE		Pathologie chirurgicale.
FUNCK - BRENTANO.		Pathologie chirurgicale.
GALLIARD		Parasitologie.
GARCIN		Pathologie médicale.
Mlle GAUTHIER-VILLARS,		Anatomie pathologique.
DE GENNES		Pathologie médicale.

MM.

GIROUD		Histologie.
HAGUENAU		Pathologie médicale.
HALPHEN		Oto - rhino - laryngologie.
JOANNON		Hygiène.
LACOMME		Obstétrique.
LANTUEJOUL	..	Obstétrique.
LAVIER		Parasitologie.
LELONG		Pathologie médicale.
LEMAIRE		Pathologie expérimentale.
LENEGRE		Pathologie médicale.
Mlle J. LEVY	...	Pharmacologie.
MARCHAL		Pathologie médicale.
MENEGAUX		Pathologie chirurgicale.
MOLLARET	...	Pathologie médicale.
MOUQUIN		Pathologie médicale.
PATEL		Pathologie chirurgicale.
PETIT - DUTAILLIS.		Pathologie chirurgicale.
RENARD		Ophtalmologie.
RICHET		Physiologie.
SENEQUE		Pathologie chirurgicale.
SICARD		Pathologie chirurgicale.
SOULIE		Pathologie médicale.
SUREAU		Obstétrique.
TURPIN		Pathologie médicale.
WILMOTH		Pathologie chirurgicale.

III. — AGREGES RAPPELES A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.

ALGLAVE		Pathologie chirurgicale.
BUSQUET		Pharmacologie.
CHAILLEY-BERT.		Physiologie.
GUENIOT		Obstétrique.
HEITZ-BOYER	..	Pathologie chirurgicale.

MM.

HUGUENIN		Anatomie pathologique.
LE LORIER		Obstétrique.
NEVEU-LEMAIRE.		Parasitologie.
PIEDELIEVRE	..	Médecine légale.
VAUDESCAL		Obstétrique.

IV. — AGREGES CHARGES DE COURS
DE CLINIQUE ANNEXE
A TITRE PERMANENT

MM.		MM.	
ALAJOUANINE ..	Clinique médicale	BASSET	Clinique chirurgicale
BRULE		BROCQ	
CATHALA		CADENAT	
CHABROL		FEY	
CHEVALLIER		GATELLIER	
DONZELOT		de GAUDART	
DUVOIR		d'ALLAINES ..	
GASTINEL		LEVEUF	
LAROCHE (G.) ..		MOULONGUET ..	
LIAN		MOURE	
MOREAU		QUENU	
SEZARY			
MM.			
EGALLE	Clinique obstétricale.		
METZGER			
PORTES			
VIGNES			

V. — CHARGES DE COURS

CHAILLEY-BERT ,agréé	Education physique.
LEDOUX-LEBARD	Radiologie clinique.
RUPPE	Stomatologie.
WEIL-HALLE	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans des dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LÉON BINET

Professeur de Physiologie à la Faculté de Médecine de Paris

Membre de l'Académie de Médecine

Médecin de l'Hôpital Necker

*Hommage respectueux pour
l'honneur qu'il a bien voulu nous
faire en acceptant la présidence
de cette thèse.*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA GLYCOLYSE

INTRODUCTION

Le fait que le muscle excité devient acide en l'absence de circulation sanguine, et le fait qu'il se forme de l'acide lactique pendant que le muscle meurt et subit la rigidité cadavérique sont des phénomènes anciennement connus. Claude BERNARD avait déjà remarqué la formation de l'acide lactique dans le muscle en activité.

La formation de cet acide pendant la contraction du muscle isolé, ainsi que l'analogie de ce phénomène avec la formation d'acide lactique pendant la mort du muscle, ont été élucidées pour la première fois par W.-M. FLETCHER et F.-G. HOPKINS (1907).

Les déterminations ont été faites sur les quantités d'acide lactique fournies par les muscles des pattes de grenouille. Ces auteurs ont attiré l'attention sur les causes d'erreurs dues à la manière de faire l'extraction, erreurs qui antérieurement avaient fait obtenir à d'autres chercheurs, des résultats si discordants.

Si on fait l'extraction du muscle préalablement refroidi, par l'alcool à 0° (immersion et désintégration dans ce liquide), on évite la formation d'acide lactique pendant la manipulation.

Il résulte de leurs travaux que la teneur en acide lactique du muscle fraîchement excisé et intact est très faible et qu'elle provient, probablement, du traitement inévitable que l'on fait subir au muscle avant l'extraction.

Le traumatisme mécanique, le chauffage ainsi que l'irritation chimique (par l'alcool ou le chloroforme) ont pour résultat une grande augmentation de l'acide lactique.

Dans des muscles excisés, privés de leur circulation et maintenus au repos en anaérobiose, dans une atmosphère d'azote ou d'hydrogène, il se forme spontanément de l'acide lactique pendant la période de survie durant laquelle le muscle est encore excitable.

La fatigue du muscle due à la contraction s'accompagne également d'une augmentation de la quantité d'acide lactique.

Un autre changement chimique que l'on peut mettre en évidence pendant la contraction musculaire, est la disparition de glycogène. Le glycogène se trouve en grande quantité dans le muscle et pendant l'activité, *en absence d'oxygène*, une partie disparaît et une quan-

tité équivalente d'acide lactique apparaît (O. MEYERHOF 1920).

Le glycogène est donc le précurseur de l'acide lactique. Il a été démontré qu'il subit une série de transformations avant d'aboutir à la formation d'acide lactique.

La transformation du glycogène en acide lactique a été constatée, non seulement dans un muscle intact et isolé, mais aussi dans un jus de presse musculaire, dans du muscle haché, ainsi que dans une solution de ferment glycolytique extrait du muscle et ne contenant plus d'éléments cellulaires.

L'étude des étapes intermédiaires de la glycolyse a été surtout faite dans des extraits musculaires. En effet, dans un muscle intact, certains stades intermédiaires labiles pourraient échapper à l'analyse. Il serait d'autre part impossible de séparer de toute contingence le phénomène que l'on veut étudier.

Les résultats obtenus en étudiant la glycolyse dans des extraits musculaires peuvent être étendus au cas du muscle intact et du muscle broyé.

On a constaté là aussi que la présence des phosphates est indispensable à la glycolyse, que, au cours de la formation d'acide lactique, les phosphates inorganiques diminuent et qu'ils se forment les mêmes esters phosphoriques que dans des solutions d'extraits mus-

culaires : esther hexose mono-phosphorique d'EMBDEN, ester di-phosphorique de HARDEN et YOUNG, ester di-phosphorique de LIPMANN et LOHMANN.

L'acide adényl-pyrophosphorique est nécessaire dans tous les cas comme coferment, ainsi qu'un sel de magésium.

D'autres phénomènes intervenant dans la glycolyse sont identiques dans les extraits et dans les cellules intactes, avec ou sans structure musculaire.

Dans l'ensemble, les faits principaux établis avec les solutions de ferments musculaires se retrouvent dans les jus de presse musculaire, dans les muscles broyés et dans les muscles excisés. Mais ceci à trait à la dégradation anaérobie des glucides. Or on sait que la dégradation des glucides comporte deux phases, l'une anaérobie menant à la formation d'acide lactique, l'autre aérobie, nécessitant donc la présence d'oxygène.

Que se passe-t-il pendant la phase aérobie ?

FLETCHER (1904) a montré que le muscle au repos et le muscle après fatigue ont des propriétés osmotiques différentes, dûes probablement à la présence ou à l'absence de certains métabolites. La mise en présence d'oxygène du muscle fatigué, lui rend les propriétés osmotiques du muscle au repos. De même la rigidité cadavérique est diminuée, ou même annulée, en présence d'oxygène (W.-M. FLETCHER 1902).

En exposant des muscles fatigués à une atmosphère d'oxygène, à une température de 15° à 18°, on constate une diminution de la quantité d'acide lactique (W.-M. FLEICHTER et F.-G. HOPKINS 1907). Les courbes illustrant cette diminution en fonction du temps ont un caractère exponentiel, comme on devrait s'y attendre si la quantité d'acide lactique disparaissant à un moment donné était relié par une relation simple à celle existant dans le muscle à ce moment.

Nous avons vu qu'en l'absence d'oxygène il y a un accroissement d'acide lactique dans le muscle, mais on ne sait pas si cet accroissement continue en présence d'oxygène en même temps qu'il y a destruction d'une quantité déjà formée, ou si la formation est inhibée en présence d'oxygène, laissant apparaître seulement la perte de l'acide.

Le processus d'oxydation peut être compliqué par une diffusion imparfaite de l'oxygène dans la masse musculaire. Dans ce cas, le muscle finement découpé ou broyé pourrait, soumis à l'action de l'oxygène, mieux mettre en évidence son influence.

Or il est apparu que dans ce cas (selon FLETCHER et HOPKINS) l'oxygène n'a aucun effet, il se comporte comme un gaz inerte. La structure du muscle serait donc nécessaire pour l'effet d'oxydation.

En ce qui concerne le muscle intact excisé, O. MEYERHOF (1920) a confirmé et étendu les résultats de FLETCHER et HOPKINS. Il trouve qu'un muscle (gastrocnémien de grenouille) fatigué par des secousses électriques, en anaérobiose, soumis ensuite à une atmosphère d'oxygène pendant 15 à 24 heures à 14°, présente une respiration augmentée par rapport à celle du muscle au repos. Il disparaît en même temps de l'acide lactique. L'intensité respiratoire augmente proportionnellement à la teneur en acide lactique. Ces deux phénomènes sont donc liés. Cette manière de voir a été confirmée par O. MEYERHOFF, K. HOHMANN et R. MEIER (1925) qui constatent une augmentation de 70 % à 180 % de la fixation d'oxygène par le muscle, en présence de lactate au de pyruvate de sodium.

En ce qui concerne la quantité d'acide lactique disparu et la quantité d'oxygène fixée, O. MEYERHOF trouve que pour trois molécules d'oxygène fixées, il disparaît trois à quatre molécules d'acide lactique. (En ceci, ce travail est en désaccord avec le travail de PARNAS (1915), qui trouve que l'oxygène absorbé correspond à l'acide lactique disparu.)

Il se dégage en même temps du gaz carbonique. Le
CO₂
rapport — est égal à 1. L'oxygène sert donc à brûler
O₂
l'acide lactique, jusqu'à l'état de gaz carbonique. Une

partie ($1/4$ ou $1/3$) de l'acide lactique disparaît donc en aérobiose, le reste disparaît sans intervention d'oxygène.

De même, si après avoir laissé s'accumuler l'acide lactique dans un muscle au repos et en anaérobiose, on le met en présence d'oxygène, il y a fixation d'oxygène et disparition d'acide lactique. Dans ce cas aussi, l'oxygène fixé correspond au quart ou au tiers de l'acide lactique disparu.

En ce qui concerne le muscle haché, la glycolyse est plus intense que dans le muscle intact; elle peut être augmentée jusqu'à vingt fois, selon O. MEYERHOF.

Selon le travail de FLETCHER et HOPKINS (1907), l'oxygène n'a aucun effet sur la glycolyse dans le muscle haché; la structure du muscle serait nécessaire pour qu'un effet se produisit.

O. MEYERHOF (1921), reprenant l'étude de la glycolyse dans le muscle haché, trouva qu'en suspension de solution de phosphates de pH 8, la vitesse de formation de l'acide lactique est diminuée en présence d'oxygène, quoiqu'on n'arrive jamais à l'inhiber complètement. Ceci s'explique par la grande vitesse de formation de l'acide lactique. Une certaine quantité d'oxygène est fixée. L'acide disparu ne correspond pas à l'oxygène fixé, il y a quatre à cinq fois plus de molécules d'acides disparues que l'oxygène n'en peut brû-

ler. Le quotient d'oxydation, c'est-à-dire la grandeur représentée par le rapport : $\frac{\text{acide lactique disparu}}{\text{équivalent en ac. lactique oxydé}}$ est d'environ 4,8. (Dans le muscle intact 4,3).

Si du lactate est ajouté, la respiration n'augmente pas, mais cela n'est pas étonnant car l'acide lactique se trouve déjà en excès. On peut mettre en évidence l'influence du lactate d'une manière indirecte. En diminuant la quantité déjà existante par un lavage léger du muscle ou en inhibant sa formation par du fluorure de sodium 10⁻² N.

Dans le premier cas (O. MEYERHOF 1919), en ajoutant du lactate on augmente la respiration de 50 à 100 %. Dans le deuxième cas, l'addition de lactate élimine presque complètement l'effet inhibiteur du fluorure (F. LIPMANN 1928) sur la respiration du muscle.

Le comportement du muscle haché est important, car il montre 1) que l'influence de la respiration sur la décomposition des hydrates de carbone ne dépend pas de l'intégrité de la structure musculaire; 2) que la manière dont la respiration agit sur la formation de l'acide lactique est déterminée par l'intensité de la respiration.

Dans l'extrait musculaire, l'intensité de la glycolyse est la même en présence ou en absence d'oxygène. Le comportement de l'extrait musculaire diffère donc

de ceux du muscle intact et du muscle haché, en ce qui concerne la dégradation aérobie des hydrates de carbone.

Comment interpréter la diminution du glucose en présence d'oxygène ? FLETCHER et HOPKINS avaient suggéré qu'une partie au moins de l'acide lactique disparu pouvait être resynthétisé en glucides.

MEYERHOF, en se basant sur la relative constance
du quotient d'oxydation $\frac{\text{acide lactique disparu}}{\text{équivalent en acide lactique oxydé}}$
 CO_2
et sur le rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1$, conclut à une resynthèse
en glycogène.

O. MEYERHOF, K. HOHMANN et R. MEIER (1925) ont cherché à mettre en évidence la resynthèse des hydrates de carbone dans des muscles de grenouille perfusés avec une solution de Ringer saturée d'oxygène et contenant du lactate de sodium. Mais les faibles quantités dosées, ainsi que les minimes différences constatées avant et après perfusion, ne permettent pas de conclure avec certitude qu'une resynthèse a lieu.

De plus, ces résultats ne s'obtiennent pas avec une suspension de muscle haché, malgré l'action inhibitrice de l'oxygène.

Quant à la glycolyse dans les extraits fermentaires, nous avons signalé que l'oxygène n'a aucune influence; la formation d'acide lactique est la même en absence ou en présence d'oxygène.



Par analogie avec le fait découvert par PASTEUR concernant la diminution de la fermentation alcoolique en présence d'oxygène, on désigne aussi sous le nom de réaction de PASTEUR la diminution de la glycolyse en présence d'oxygène.

Comme nous avons vu plus haut, une des explications de la réaction de PASTEUR dans le muscle, due à O. MEYERHOF, admet qu'il se produit une resynthèse du glycogène à partir de l'acide lactique, mais les faits apportés à l'appui de cette hypothèse sont peu convaincants.

Suivant une autre théorie l'effet de l'oxygène est d'inactiver le système catalytique de la glycolyse.

A l'appui de cette dernière hypothèse F. LIPMANN (1933) a montré que le 2,6 dichlorophénol-indophénol inhibe la glycolyse en présence d'oxygène. Mais, d'autre part, L. MICHAELIS et C.-V. SMITHE (1936), ont attiré l'attention sur la toxicité de certains indicateurs d'oxydo-réduction sur des systèmes diastasiques.

Il fallait donc s'assurer d'abord que l'inhibition du

système glycolytique par des indicateurs d'oxydo-réduction était due à une oxydation et non à leur effet toxique.

Nous avons signalé que la glycolyse dans les extraits musculaires se fait avec la même intensité en présence ou en l'absence d'oxygène. La réaction de PASTEUR n'existe pas dans les solutions de ferment.

C'est justement cette particularité qui permettra d'étudier le mécanisme de cette réaction.

Deux hypothèses sont à envisager pour expliquer le manque d'action de l'oxygène sur la glycolyse dans les extraits musculaires :

1) L'agent catalytique nécessaire à la transformation de l'acide lactique ne se trouve pas dans l'extrait.

2) Un pigment transporteur d'oxygène indispensable à la réaction de PASTEUR, et inhibant la glycolyse par oxydation du système catalytique, n'a pas été extrait du muscle.

Dans ce dernier cas, on devrait pouvoir inhiber la glycolyse par des oxydants doux, tels les indicateurs d'oxydo-réduction.

Dans un travail antérieur (N. MAYER 1939) nous avons étudié l'action de plusieurs indicateurs d'oxydo-réduction sur la glycolyse dans des extraits musculaires préparés par la méthode de O. MEYERHOF (1926).

Ces indicateurs étaient: le 2,6-dibromophénol indophénol, le 1 naphtol-2 sulfonate-indophénol, le bleu de tolylène, le bleu de méthylène et la phénosafranine.

La glycolyse est complètement inhibée par le 2,6 dibromophénol-indophénol et le 1-naphtol-2 sulfonate indophénol. Il y a inhibition partielle, mais assez marquée, par le bleu de tolylène. Le bleu de méthylène a une action faible. La phénosafranine n'en a aucune. Le degré d'inhibition augmente avec le degré de réduction des colorants, suivi électrométriquement. La phénosafranine qui n'est pas du tout réduite, n'inhibe pas la glycolyse.

Il n'en est pas de même pour le 1-naphtol-2 sulfonate indophénol, qui inhibe fortement la glycolyse, quoiqu'il ne soit que très peu réduit.

Pour s'assurer que l'inhibition est due à l'oxydation du système glycolytique et non à son effet toxique, l'effet des leuco dérivés des deux colorants les plus fortement inhibiteurs: le 2,6 dibromophénol-indophénol et le 1 naphtol-2-sulfonate-indophénol, a été étudié. Le leuco-dérivé du premier n'a aucune action sur la glycolyse. Le 2,6-dibromophénol-indophénol agit donc sur la glycolyse probablement par oxydation. Quant au leuco-dérivé du second, il a une action inhibitrice. Dans ce cas, il s'agit non d'une oxydation, mais d'un effet « toxique » comme celui remarqué par L. MICHAELIS et C. SMITHE.

CHAPITRE PREMIER

INACTIVATION DU SYSTEME CATALYTIQUE DE LA GLYCOLYSE

Des faits exposés plus haut, il apparaît qu'il y a une corrélation entre la réduction des colorants et le degré d'inhibition de la glycolyse. L'inhibition de la glycolyse est d'autant plus grande que le potentiel du colorant est plus élevé.

Ceci plaide en faveur de l'hypothèse suivant laquelle le système glycolytique du muscle nécessiterait, pour son activité, la présence de certains groupements réduits.

La réaction de PASTEUR pourrait donc être interprétée comme étant due à l'inactivation du système glycolytique par oxydation.

Parmi les indicateurs d'oxydo-réduction, le 2,6 dibromophenol-indophénol présente l'action la plus marquée: il inhibe complètement la glycolyse dans les extraits musculaires. C'est pour cette raison que nous

l'avons employé comme agent inhibiteur de la glycolyse dans le présent travail.

Le système glycolytique, sur lequel nous l'avons fait agir, était constitué par l'extrait musculaire. La réaction de PASTEUR n'a pas lieu naturellement dans cet extrait, mais elle peut être provoquée par l'action des oxydants. C'est ce qui le rend particulièrement approprié à l'étude du mécanisme de cette réaction.

TECHNIQUE. — *Préparation de l'extrait glycolytique.* — Le système glycolytique était constitué par l'extrait musculaire préparé par la méthode de O. MEYERHOF (1926).

Du muscle de lapin fraîchement tué, est mis à refroidir dans un mélange de glace et de sel. Après environ une heure de refroidissement, il est découpé en tranches très fines que l'on immerge dans de l'eau ou dans une solution de chlorure de potassium à 9 0/00. Ces solutions sont préalablement refroidies dans de la glace. Les proportions respectives sont en poids : deux de muscle pour trois d'eau. On agite de temps en temps. Après environ une demi-heure, on sépare la pulpe à l'aide d'une mousseline. On centrifuge ensuite; on obtient un liquide limpide, qui contient le système glycolytique du muscle.

Composition de l'extrait fermentaire. — L'extrait fermentaire est composé d'une partie thermolabile non

dialysable, et d'une partie thermostable et dialysable.

La partie thermolabile est précipitable par l'acétone. La partie dialysable ou coferment renferme des phosphates, un sel de magnésium et de l'acide adénylpyrophosphorique.

On trouve normalement dans les extraits musculaires un autre composé: l'acide créatinephosphorique.

Le système fermentaire a deux actions : hydrolysante et glycolytique.

En effet, les extraits musculaires sont capables d'hydrolyser l'acide adénylpyrophosphorique et l'acide créatinephosphorique. Cette hydrolyse est de nature fermentaire.

L'extrait musculaire chauffé pendant 15 minutes à 37° hydrolyse le glycogène en glucose, ainsi que le trihexosane, l'amylopectine, l'amylose et l'amidon. L'action la plus importante de l'extrait musculaire est son action glycolytique, c'est-à-dire la transformation des glucides en acide lactique. Le glucide attaqué peut être le glycogène, l'amidon, le di ou trihexosane, le glucose, le fructose, le mannose, et le maltose. Le saccharose, l'amylotriose, l'amylobiose ne sont pas attaqués.

Afin de se placer dans les meilleures conditions de glycolyse on ajoute à l'extrait musculaire 1/6 de son volume d'une solution tampon de phosphates M/10 de

p H 7,4 et 1/9 de son volume d'une solution de bicarbonate de sodium à 2,6 %. Lorsque les manipulations sont de longue durée, ou si l'extrait fermentaire n'est pas fraîchement préparé, on lui ajoute une solution d'acide adénylpyrophosphorique, exactement neutralisé.

Préparation de l'acide adénylpyrophosphorique.

— L'acide adénylpyrophosphorique a été préparé suivant la technique de K. LOHMANN (1931) à partir des muscles des pattes postérieures de grenouilles (*rana temporaria*):

On refroidit les grenouilles vivantes dans de la glace. On coupe les pattes postérieures et on les pèse avant et après avoir enlevé les muscles. Cette opération doit se faire très rapidement (un aide est nécessaire). On écrase les muscles dans de l'acide trichloracétique à 10 % (refroidi avec le mortier à 0°), jusqu'à ce que l'on ait 100 grammes de muscles pour 100 grammes d'acide trichloracétique. On exprime à travers une mousseline et on continue l'extraction avec le même volume d'acide trichloracétique à 4 %. On mélange les liquides et on centrifuge. On ajoute ensuite de la soude à 20 %, en présence de congo. La réaction doit rester encore acide, franchement bleue au papier de congo (p H 3,6 environ). Le liquide partiellement neutralisé est additionné d'un volume égal

d'alcool absolu. Après un temps court, il se sépare un précipité floconneux que l'on élimine par centrifugation. (Le précipité est constitué principalement par du glycogène).

A la solution alcoolique limpide, on ajoute ensuite une solution d'acétate de baryum à 25 %, jusqu'à ce que la réaction ne soit plus acide au papier de congo. On laisse se rassembler le précipité et on centrifuge ensuite.

On met le précipité en suspension dans de l'eau (le sixième du volume de la solution alcoolique) et on le fait passer en solution en ajoutant de l'acide chlorhydrique (concentration finale $n/10$ à $n/5$). On centrifuge les parties insolubles et on neutralise de nouveau (réaction franchement bleue au congo). On ajoute le même volume d'alcool absolu et on précipite de nouveau à l'acétate de baryum. On attend de nouveau que le précipité se rassemble et on centrifuge. Le précipité est séché dans le vide, sur du chlorure de calcium.

INACTIVATION DU FERMENT GLYCOLYTIQUE PAR LE 2,6 DIBROMOPHÉNOL-INDOPHÉNOL

De manière assez constante, 1 cc. du mélange :
extrait + $1/6$ d'une solution de phosphates de sodium $M/10$ de p H 7,4 + 1,9 d'une solution de bicar-

bonate de sodium à 2,6 % est inactivé par 0,2 cc. d'une solution aqueuse de 2,6 dibromophénol-indophénol M/200, agissant pendant 40 minutes, à température ordinaire et à l'abri de l'air.

Dans les mêmes conditions, le leuco-dérivé de 2,6 dibromophénol-indophénol n'a aucune action sur le ferment glycolytique, comme il résulte du tableau I.

TABLEAU N° I

Acide lactique en milligrammes

Extrait seul	Extrait + 2,6 dibromophénol-indophénol
6,3	— 0,1
6,8	— 0,4
5,3	+ 1,6
4,6	+ 0,1
5,0	— 0,2
4,8	— 0,3
5,2	+ 0,8
3,5	+ 0,3

Extrait seul	Extrait + leuco dérivé de 2,6 dibromophénol-indophénol
5,8	5,2
7,8	6,3
5,3	5,3

CHAPITRE II

REACTIVATION DU FERMENT GLYCOLYTIQUE INHIBE PAR OXYDATION

Nous avons déjà signalé l'action des indicateurs d'oxydo-réduction, sur les extraits glycolytiques. La corrélation existant entre le degré de réduction des colorants et le degré d'inhibition de la glycolyse suggère une inactivation par oxydation.

L'inactivation complète par le 2,6 dibromophenol-indophénol, tandis que son leuco-dérivé reste sans action, vient à l'appui de cette manière de voir.

La réaction de PASTEUR peut donc être assimilée à une inactivation du système glycolytique par oxydation. Pour que ce phénomène puisse avoir une signification physiologique, il doit être réversible, c'est-à-dire que le système glycolytique inhibé doit pouvoir être réactivé par réduction.

Afin de pouvoir mettre en évidence la réactivation

du système glycolytique inhibé par oxydation, nous avons opéré de la manière suivante:

Le mélange glycolytique contenant l'extrait musculaire auquel on ajoutait $1/6$ de son volume d'une solution de phosphates de sodium M/10 de p H 7,4 et $1/9$ de son volume d'une solution de bicarbonate de sodium à 2,6 % était soumis à l'action oxydante du 2,6 dibromophénol-indophénol (0,2 cc. de solution M/200 de colorant pour 1 cc. de mélange glycolytique). L'action oxydante se poursuivait, comme nous l'avons déjà indiqué pendant 40 minutes, à température ordinaire et à l'abri de l'air. On prélevait ensuite une certaine quantité de solution (en général 30 cc.), à laquelle on ajoutait la quantité de cystéine nécessaire à la réduction du faible excès de colorant (0,05 à 0,10 cc. de solution de cystéine M/5 pour 30 cc. de mélange). Des prises de 5 cc. étaient alors introduites dans un des compartiments de tubes THUNBERG. Dans l'autre compartiment se trouvait 1 cc. d'une solution de glycogène à 2 % et 0,5 cc. d'une solution d'acide adénylpyrophosphorique M/400 exactement neutrolisée, ou 1,5 cc. H₂O pour la série témoin.

On faisait le vide et laissait se poursuivre la glycolyse pendant une à deux heures, à 26°, après avoir mélangé le contenu des deux compartiments. On effectuait ensuite le dosage d'acide lactique dans les différents tubes. Ces expériences servaient à déterminer le

degré d'inhibition du système glycolytique au début de l'action de l'agent réducteur ; elles ont été effectuées pour chaque série d'expériences.

ACTION DE LA CYSTÉINE

Afin de mettre en évidence l'action de la cystéine, on mettait en présence 30 cc. de solution inactivée et 5 cc. de solution de cystéine M/5. La solution de cystéine était préparée par dissolution dans de l'eau privée d'oxygène par barbotage d'azote putréfié. Au moment de l'emploi cette solution était exactement neutralisée par de la soude.

On laissait se poursuivre la réduction à 26° à l'abri de l'air (dans le vide). Les solutions ainsi traitées avaient une concentration en ions hydrogène d'environ pH 8. A ce pH, le temps nécessaire pour que la réduction par la cystéine s'effectue était de trois à quatre heures. Nous avons laissé, en général, agir la cystéine pendant quatre heures.

A la fin du temps d'incubation, la solution glycolytique contenant la cystéine ne subissait plus aucun traitement. Des prises de 5 cc. étaient distribuées dans une série de tubes THUNBERG. On ajoutait à certains tubes (témoins) 1,5 cc. H₂O et aux autres 1 cc. d'une solution de glycogène à 2 % et 0,5 cc. d'une solution d'acide adénylpyrophosphorique M/400

(exactement neutralisée). L'addition de l'acide adényl-pyrophosphorique, qui est un des composants du système glycolytique, est indispensable. En effet, c'est à sa labilité qu'est due l'inactivation spontanée d'un extrait musculaire, comme nous l'avons déjà indiqué, et sa présence dans un tel extrait lui rend son activité.

On faisait le vide dans les tubes, on mélangeait le contenu des deux compartiments et on laissait se poursuivre la glycolyse à 26° pendant une à deux heures.

Le contenu des tubes était ensuite transvasé dans des fioles jaugées de 25 cc. On ajoutait alors 4 cc. d'acide chlorhydrique 2/3 N et 4 cc. d'une solution de tungstate de sodium à 10 %. On amenait à 25 cc., agitait, puis laissait reposer trente minutes. On centrifugeait ensuite.

Dans ce liquide, les glucides étaient éliminés selon la méthode de SALKOWSKY : 15 cc. du liquide de centrifugation étaient introduits dans des fioles jaugées de 50 cc. On neutralisait en présence de bleu de bromothymol, puis on ajoutait 12,5 cc. d'une solution d'eau de chaux à 10 % et 7,5 cc. d'une solution de sulfate de cuivre à 20 %. On amenait à 50 cc., on agitait puis on laissait reposer pendant la nuit. On centrifugeait ensuite. Dans le liquide de centrifugation, on dosait l'acide lactique suivant la méthode de FRIEDMANN, COTONIO et SCHAEFFER (1927).

Dosage de l'acide lactique. — Le principe de cette méthode consiste dans l'oxydation de l'acide lactique en aldéhyde acétique par du permanganate. L'aldéhyde est entraîné au fur et à mesure de sa production par un courant d'air; on la recueille dans une solution de bisulfite. L'excès de bisulfite est ensuite détruit et le dosage du bisulfite combiné à l'aldéhyde permet de calculer la quantité d'acide lactique.

Une certaine quantité du liquide de centrifugation (habituellement 25 cc.) est introduite dans un ballon de 200 cc.; on ajoute 10 cc. d'acide sulfurique 10 N contenant 10 % de sulfate de manganèse et assez d'eau pour amener le volume à 80-100 cc. Une pincée de poudre de talc est ajoutée. Le ballon est ensuite relié à l'aide d'un bouchon de caoutchouc percé de deux trous, d'une part à un condenseur, d'autre part à un tube à entonnoir se rendant au fond du ballon. Le condenseur est relié à deux absorbeurs placés en série et contenant chacun environ 10 à 15 cc. de solution de bisulfite à 10 %. Les tubes plongeant dans le bisulfite sont effilés. A l'aide d'une trompe, on fait passer un courant d'air dans tout l'appareil. On place le ballon dans un bain-marie bouillant à 105° (eau plus sel de cuisine) et, par le tube à entonnoir, on fait couler une solution de permanganate dont la concentration varie de $n/100$ à $n/500$, suivant la quantité à oxyder. La vitesse d'introduction du permanganate dans

le liquide à oxyder a une importance capitale, car en présence d'un excès de permanganate l'oxydation va plus loin que le stade aldéhyde acétique. Il en résulterait des erreurs par défaut de l'acide lactique dosé, si la vitesse d'admission du permanganate était trop grande. La solution de permanganate doit donc être suffisamment diluée, les gouttes doivent tomber lentement, de manière à ce que la solution ne soit jamais rosée pendant l'oxydation. L'oxydation est terminée lorsque le liquide garde une teinte rose persistante qui se transforme ensuite en brun, couleur due au bioxyde de manganèse qui se forme. A ce moment, on arrête le chauffage; on continue pendant cinq minutes encore le passage du courant d'air dans l'appareil. Le contenu des absorbeurs est alors transvasé dans un verre à pied; on détruit l'excès de bisulfite par une solution d'iode $n/10$ en présence d'empois d'amidon. Le virage est terminé avec une solution d'iode $n/100$. La combinaison bisulfitique est décomposée par 40 cc. d'une solution contenant 100 grammes de phosphate disodique et 100 grammes de bicarbonate de potassium pour 1 litre d'eau. On titre le bisulfite libéré par une solution d'iode $n/100$. 1 cc. d'iode $n/100$ correspond à 0,45 mg. d'acide lactique.

Les résultats de ces expériences sont résumés par les données du tableau N° II.

TABLEAU N° II

Acide lactique en milligrammes		
Extrait seul	Extrait + 2,6 dibromophé- nol-indophénol	Extrait + 2,6 dibromophé- nol-indophénol puis cystéine
3,5	+ 0,8	4,3
3,7	+ 0,3	2,8
7,0	+ 0,8	5,2
5,0	— 0,7	5,4
5,4	+ 0,4	5,0
	+ 0,7	5,1
4,8	0	5,1

Action du colorant : 40 minutes à l'abri de l'air.

Il ressort de ce tableau que la cystéine réactive le système glycolytique inhibé par action de 2,6 dibromophénol-indophénol.

Un extrait glycolytique normal ne présente pas d'augmentation de la glycolyse, après incubation avec la cystéine dans les mêmes conditions qu'un extrait inactivé par oxydation, ainsi qu'il ressort du tableau N° III.

TABLEAU N° III

Acide lactique en milligrammes	
Extrait seul	Extrait + cystéine
8,0	6,2
6,1	7,2
7,0	7,1

Extrait glycolytique, non traité, mis en présence de cystéine pendant 4 heures à 26°.

Le temps d'action du colorant, ainsi que les conditions d'action, ont une grande importance. L'oxydation doit se poursuivre rigoureusement dans les conditions indiquées plus haut, c'est-à-dire : 0,2 cc. de solution M/200 de 2,6 dibromophénol-indophénol pour 1 cm³ de mélange glycolytique, temps d'action 40 minutes, à l'abri de l'air.

Si, en respectant les concentrations indiquées, on laisse se poursuivre la réaction à l'air, on n'arrive plus à réactiver l'extrait. Dans ce cas l'oxydation va probablement trop loin et devient irréversible, comme il ressort du tableau N° IV.

TABLEAU N° IV

Acide lactique en milligrammes

Extrait seul	Extrait + 2,6 dibromophénol-indophénol	Extrait + 2,6 dibromophénol-indophénol, puis cystéine
5,2	+ 0,4	+ 0,5
5,0	—	+ 1,2
4,8	— 0,6	— 0,1
5,0	— 0,2	+ 0,1

Action du colorant 40 minutes, en présence de l'air.

Le même phénomène s'observe si, malgré l'absence d'oxygène, l'oxydation se poursuit en présence d'un excès de colorant.

ACTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

Si on fait agir un autre réducteur, tel l'acide ascorbique, sur le système glycolytique inhibé par 2,6 dibromophénol-indophénol, dans les conditions dans lesquelles la cystéine le réactive complètement, on ne constate aucune action. Le système glycolytique reste inactif.

Mais, dans ce cas, on constate une action inhibitrice du système glycolytique normal par l'action, après quelques heures même du leuco dérivé de 2,6 dibromophénol-indophénol, en présence d'acide ascorbique, comme il ressort du tableau N° V.

TABLEAU N° V

Acide lactique en milligrammes

Extrait seul	Extrait + leuco dérivé de 2,6 dibromophénol-indophénol
5,4	1,5
5,0	3,8
5,0	1,4
4,5	2,6

Le leuco dérivé est préparé par action de l'acide ascorbique sur le colorant. L'extrait fermentaire est mis en présence du leuco dérivé et de l'acide ascorbique pendant 4 heures à 26°, à l'abri de l'air.

Le tableaux N° VI et N° VII mettent en évidence le fait que ni l'acide ascorbique seul, ni le leuco dérivé obtenu par l'action de la cystéine sur le 2,6 dibromo-

phénol-indophénol n'ont d'effet inhibiteur, après action de quelques heures sur un extrait fermentaire.

TABLEAU N° VI

Acide lactique en milligrammes	
Extrait seul	Extrait + leuco-dérivé de 2,6 dibromophénol-indophénol
3,6	3,7
7,0	7,0
5,4	6,0

Le leuco dérivé est préparé par action de la cystéine sur le colorant. L'extrait fermentaire est soumis à l'action du leuco-dérivé pendant 4 heures, à 26°, à l'abri de l'air.

TABLEAU N° VII

Acide lactique en milligrammes	
Extrait seul	Extrait + acide ascorbique
5,0	5,0
4,0	4,5
5,2	5,1

L'extrait fermentaire est soumis à l'action de l'acide ascorbique (concentration dans l'extrait M/30) pendant 4 heures, à 26°, à l'abri de l'air.

Il faut donc la présence du leuco-dérivé et de l'acide ascorbique pour que l'effet inhibiteur se produise. Cet effet est d'autant plus marqué et plus régulier que la solution diastasique est plus vieille.

ACTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE APRÈS LE TRAITEMENT
DE L'EXTRAIT FERMENTAIRE PAR LE CHARBON.

Donc, pour mettre en évidence l'action de l'acide ascorbique, il fallait éliminer le colorant. On y parvient facilement par adsorption sur du charbon médical MERCK. Dans ce but, on ajoute à la solution inactivée la faible quantité d'acide ascorbique nécessaire pour réduire le petit excès de colorant. On y ajoute alors du charbon (0,2 gr. pour 10 cc. de solution), on agite et on filtre ensuite. La solution filtrée contient encore de très légères traces de colorant. Des expériences faites avec un faible excès de colorant et des traces d'acide ascorbique ont montré leur manque d'action sur un système glycolytique normal.

Une solution de ferment glycolytique normal (c'est-à-dire non inhibé) perd son activité après traitement par le charbon. Ceci est dû à l'absorption sur le charbon de la cozymase, un des constituants du coferment glycolytique. Si on ajoute à cette solution inactive de la cozymase, on lui rend son activité.

La solution glycolytique inhibée par le 2,6 dibromophénol-indophénol, traitée ensuite par le charbon et filtrée, était soumise à l'action réductrice d'une solution d'acide ascorbique dont la concentration pour les différentes expériences variait de $M/475$ à $M/10$.

L'acide ascorbique était dissout dans de l'eau privée d'oxygène par barbotage d'azote pur. Avant l'addition, la solution était exactement neutralisée.

On ajoutait 5 cc. d'une des solutions d'acide ascorbique à 25 cc. de solution de ferment. Après avoir fait le vide, on laissait la réaction se poursuivre pendant 2 heures 30 pour certaines expériences, 4 heures pour d'autres.

Des prises de 5 cc. de ce nouveau mélange étaient distribuées dans un des compartiments d'une série de tubes THUNBERG. Dans l'autre compartiment on ajoutait : 1 cc. de solution de glycogène à 2 %, 0,5 cc. de solution d'acide adenylypyrophosphorique M/400, 0,2 cc. d'une solution de cozymase à 0,2 %.

On faisait le vide et, après avoir mélangé le contenu des deux compartiments, on laissait se poursuivre la glycolyse pendant une à deux heures à 26°.

Les solutions étaient ensuite traitées comme dans les expériences où la cystéine était l'agent réducteur (c'est-à-dire déprotéinisation par l'acide tungstique et élimination des glucides par la chaux et le sulfate de cuivre), afin de pouvoir déterminer leur teneur en acide lactique.

Dans aucun cas nous n'avons constaté de réactivation due à l'acide ascorbique, ainsi qu'il ressort du tableau N° VIII.

TABLEAU N° VIII

Acide lactique en milligrammes

Extrait seul	Extrait + 2,6 dibromophénol-indophénol	Extrait + 2,6 dibromophénol-indophénol, puis acide ascorbique
5,4	— 0,6	0
5,9	0	— 0,3
4,5	3,1	2,7
4,6	+ 0,4	+ 0,7

ACTION DE LA CYSTÉINE, APRÈS TRAITEMENT DES SOLUTIONS FERMENTAIRES PAR LE CHARBON.

Nous avons déjà signalé que les groupements actifs du système glycolytique sont labiles. En effet, si on effectue leur oxydation par le 2,6 dibromophénol-indophénol en présence de l'air, on ne constate plus de réactivation par action de la cystéine. De même, si l'oxydation s'effectue en l'absence d'oxygène, mais en présence d'un excès de colorant, on ne constate plus de réactivation par action réductrice de la cystéine.

Il se pourrait que les solutions diastasiques inhibées subissent à la surface du charbon une oxydation supplémentaire due au faible excès de colorant qui n'a pas été absorbé. Dans ce cas, elles ne seraient plus réactivables.

Afin de nous mettre à l'abri de cette cause d'erreur, nous avons effectué une série d'expériences qui comportait des témoins de réactivation par la cystéine.

Dans ce but, la solution fermentaire inhibée par le 2,6 dibromophénol-indophénol était divisée en deux parties. Dans une de ces parties, on faisait la réduction du faible excès de colorant par des traces de solution de cystéine; dans l'autre, on le réduisait par des traces d'acide ascorbique. Chacune de ces solutions était ensuite mise en présence de charbon médicinal MERCK (0,2 gr. pour 10 cc). On agitait pendant quelques minutes et on filtrait ensuite à la trompe. Chacun de ces filtrats était alors introduit dans un tube THUNBERG à boule et on lui ajoutait de la cystéine M/5 ou de l'acide ascorbique M/10 (5 cc. de solution réductrice pour 25 cc. de filtrat). La cystéine cédant un atome d'hydrogène et l'acide ascorbique en cédant deux, des solutions M/5 du premier son équivalentes en hydrogène à des solutions M/10 du second. On faisait le vide et laissait se poursuivre la réduction pendant 4 heures à 26°. Des prises de 5 cc. étaient alors distribuées dans un des compartiments de tubes THUNBERG. Dans l'autre compartiment on mettait : 1 cc. de solution de glycogène à 2 %, 0,5 cc. acide adénylpyrophosphorique neutralisé et 0,2 cc. de solution aqueuse de cozymase à 0,2 %. Des tubes témoins (qui servaient à la détermination de l'acide lactique

préformé) contenaient 1,7 cc. eau dans le deuxième compartiment. Le vide étant fait, on mélangeait le contenu des deux compartiments et laissait se poursuivre la glycolyse à 26° pendant deux heures. A ce moment, les solutions subissaient le traitement préalable au dosage de l'acide lactique. Du tableau N° IX, il ressort que la cystéine réactive les solutions glycolytiques inactivées et traitées par le charbon, tandis que l'acide ascorbique ne les réactive pas.

TABLEAU N° IX

Acide lactique en milligrammes			
Extrait seul	Extrait + 2.6 dibromophé- nol-indophénol	Extrait + 2.6 dibromophénol- indophénol, puis acide ascorbique	Extrait + 2.6 dibromophénol- indophénol, puis cystéine
5.4	— 0.6	0	5.0
5.9	0	— 0.3	3.8
4.5	3.10	2.7	2.1
4.6	+ 0.4	+ 0.7	4.2
		+ 0.3	2.4
	+ 0.9	— 0.3	2.4

Extrait partiellement inhibé. Le cystéine réactive la partie inactivée tandis que l'acide ascorbique est sans action.

R É S U M É

Nous avons vu que dans le muscle excisé, privé de sa circulation, au repos ou en activité, il se forme de l'acide lactique. Ce phénomène devient très évident si le muscle est maintenu en anaérobiose. Toute irritation du muscle, qu'elle soit d'origine mécanique ou chimique, augmente le taux d'acide lactique. Ce sont ces facteurs qui ont amené une grande discordance entre les résultats trouvés par les divers chercheurs qui ne se sont pas assez mis en garde contre ces causes d'erreurs.

Les travaux de FLETCHER et HOPKINS (1907) ont élucidé pour la première fois cette question, en passant en revue de manière critique les méthodes employées avant eux et en indiquant la méthode exacte d'extraction.

Dans un jus de presse musculaire, dans un muscle haché ou dans un extrait musculaire ne contenant plus de cellules, il y a également formation d'acide lactique.

Les substances à partir desquelles se forme cet aci-

de peuvent être le glycogène, l'amidon, le di- ou le trihexosane, le glucose, le fructose le mannose et le maltose. Le saccharose n'est pas attaqué.

Les glucides subissent toute une série de transformations avant d'aboutir à l'acide lactique, transformations représentées par le schéma de EMBDEN-MEYERHOF.

Les étapes intermédiaires sont les mêmes, qu'il s'agisse du muscle excisé, du jus de presse, du muscle haché ou de l'extrait musculaire.

La dégradation complète des glucides se fait en deux phases : l'une ne nécessitant pas la présence de l'oxygène et aboutissant à la formation d'acide lactique, l'autre nécessitant la présence de l'oxygène et pendant laquelle une partie de l'acide lactique s'oxyde en gaz carbonique.

En effet, un muscle excisé dans lequel s'est accumulé de l'acide lactique *en anaérobiose*, soit au repos, soit pendant le travail, mis en présence d'une atmosphère d'oxygène, présente une diminution de l'acide lactique, parfois jusqu'à disparition complète. Ce phénomène s'accompagne de dégagement de gaz carbonique.

Il y a disparition de trois à quatre fois plus de molécules d'acide lactique que la quantité d'oxygène fixée ne permet de prévoir.

L'addition de lactate à une solution de RINGER dans laquelle on immerge le muscle, a pour conséquence une augmentation des échanges respiratoires et une disparition d'acide lactique; la quantité disparue étant trois à quatre fois plus grande que celle qui est oxydée par l'oxygène jusqu'au stade de gaz carbonique.

La formation d'acide lactique dans le muscle, au repos ou pendant la contraction, est diminuée en présence d'oxygène.

De même, la glycolyse est diminuée en présence d'oxygène dans le muscle haché. Dans ce cas l'addition de lactate ne permet pas de voir une augmentation des échanges respiratoires, étant donné la grande quantité préexistante en raison de l'intensité de la glycolyse. Quant à l'extrait musculaire, un fait important est à signaler. La vitesse de la glycolyse est la même en présence ou en absence d'oxygène. Il n'y a donc pas de réaction de PASTEUR dans ce cas. Pour expliquer ce comportement particulier deux hypothèses sont à envisager :

- 1) Les catalyseurs nécessaires à la transformation de l'acide lactique (que l'on admette ou non une resynthèse du glycogène) ne se trouvent pas dans l'extrait musculaire.

- 2) La réaction de PASTEUR est due à une inhibition par oxydation du système glycolytique et le transpor-

teur d'oxygène indispensable ne se trouve pas dans l'extrait musculaire. Dans ce cas, il devait donc être possible de reproduire cette réaction au moyen d'un oxydant approprié, un indicateur d'oxydo-réduction, par exemple.

A l'appui de cette manière de voir, nous avons trouvé dans un travail antérieur que la glycolyse est complètement inhibée par le 2.6 dibromophénol-indophénol. Il y a inhibition partielle, mais assez marquée, par le bleu de tolylène. Le bleu de méthylène a une action faible. La phéno-saphranine n'a aucune action.

Le degré d'inhibition augmente avec le degré de réduction des colorants. La phéno-saphranine qui n'est pas du tout réduite, n'inhibe pas la glycolyse. Le 2.6 dibromophénol-indophénol qui est complètement réduit, inhibe fortement la glycolyse. Son leuco-dérivé n'a aucune action sur le système glycolytique.

Il y a une corrélation entre la réduction du colorant et le degré d'inhibition de la glycolyse. L'inhibition de la glycolyse est d'autant plus grande que le potentiel du colorant est plus élevé. Ceci plaide en faveur de l'hypothèse que le système glycolytique du muscle nécessite pour son activité la présence de certains groupements réduits.

Pour que l'inhibition de la glycolyse par oxydation du système catalytique puisse être assimilée à la réac-

tion de PASTEUR, on devait pouvoir mettre en évidence la réversibilité de ce phénomène par réduction.

Nous avons pu démontrer qu'un système fermentaire inhibé par le 2.6 dibromophénol-indophénol est réactivé par action réductrice de la cystéine.

L'acide ascorbique ne réactive pas le système glycolytique inactivé par oxydation.

CONCLUSIONS

La réaction de PASTEUR, c'est-à-dire la diminution de la glycolyse en présence d'oxygène, a reçu plusieurs explications. L'une notamment due à O. MEYERHOF (1920), admet qu'il se produit une resynthèse du glycogène à partir de l'acide lactique formé. Suivant une autre théorie, l'effet de l'oxygène est d'inactiver le système catalytique de la glycolyse.

1°. — A l'appui de cette dernière hypothèse, nous avons pu montrer que le système catalytique de la glycolyse, se trouvant dans les extraits musculaires, pouvait être inactivé par l'action d'un oxydant faible, tel le 2.6 dibromophénol-indophénol.

2°. — L'inhibition est due à l'oxydation de certains groupements actifs et non à l'effet « toxique » du colorant. En effet le leuco-dérivé du 2.6 dibromophénol-indophénol n'a aucune action sur le système fermentaire.

3°. — Pour rendre l'inhibition par oxydation assimilable à la réaction de PASTEUR et lui donner une

signification physiologique, il faut que l'on puisse réactiver par réduction le système catalytique inhibé par oxydation.

Pour pouvoir mettre ce phénomène en évidence, certaines conditions sont nécessaires.

Nous avons montré que l'oxydation doit se poursuivre en présence d'un faible excès de colorant. Cette condition doit être assurée par l'absence de l'oxygène. En effet, l'oxygène, en réoxydant constamment le colorant réduit, amènerait une augmentation relative de l'excès. Dans ce cas, le système glycolytique est inhibé irréversiblement; il en est de même si dès le début, on se trouve en présence d'un grand excès d'oxydant.

4°. — Si l'inhibition se fait dans des conditions bien déterminées, c'est-à-dire oxydant en faible excès et absence d'oxygène, le système catalytique de la glycolyse peut être réactivé par réduction.

5°. — Un extrait fermentaire inactivé par le 2.6 dibromophénol-indophénol est réactivé complètement, par la cystéine.

6°. — L'acide ascorbique est sans action sur un extrait fermentaire traité dans les mêmes conditions.

Il résulte de ce qui précède, que le système glycolytique du muscle (ou un de ses constituants au

moins) nécessite, pour être actif, la présence de groupements réduits.

Ces groupements peuvent être oxydés et réduits réversiblement.

La non-réactivation par l'acide ascorbique situe le potentiel d'oxydo-réduction des groupements actifs à un niveau plus bas que celui de cet acide.

La réactivation par la cystéine, étant donnée la grande concentration utilisée, situe ce même potentiel à un niveau plus élevé ou très voisin de celui de la cystéine.

On peut donc conclure que la diminution de la glycolyse dans les cellules en présence d'oxygène est dûe, au moins en partie, à une inhibition réversible, par oxydation, du système catalytique de la glycolyse.

Vu	Vu
Le Doyen :	Le Président de la Thèse :
BAUDOUIN	L. BINET

Vu et permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté des Sciences
Chargé des Fonctions
de Recteur de l'Académie de Paris
Ch. MAURAIN

BIBLIOGRAPHIE

FLETCHER (W.-M.). — The relation of oxygen to the survival metabolism of muscle. (*The Journ. of Physiol.* (1902), t. 28, p. 474).

— The osmotic properties of muscle, and their modifications in fatigue and rigor. (*The Journ. of Physiol.* (1904), t. 30, p. 414).

FLETCHER (W.-M.) et HOPKINS (F.-G.). — Lactic acid in amphibian muscle. (*The Journ. of Physiol.* (1907), t. 35, p. 247).

FRIEDMANN (T.-E.), COTONIO (M.) et SCHAEFFER (P.-A.). — The determination of lactic acid. (*Journ. Biol. Chem.* (1927), t. 73, p. 335).

LIPMANN (F.). — Versuche zum Mechanismus der Fluorid wirkung. (*Biochem. Zeitsch.* (1928), t. 196, p. 3).

— Über die oxydative Hemmbarkeit der Glykolyse und den Mechanismus der Pasteurschen Reaktion. (*Biochem. Zeitsch.* (1933), t. 265, p. 133).

LOHMANN (K.). — Darstellung der Adenylpyrophosphorsäure aus Muskulatur. (*Biochem. Zeitsch.* (1931), t. 233, p. 460).

- Konstitution der Adenylpyrophosphorsäure und Adenosin-diphosphorsäure. (*Biochem. Zeitsch.* (1935), t. 282, p. 120).

MAYER (N.). — Sur l'inhibition de la glycolyse. (*C. R. Soc. Biol.* (1939), t. CXXX, p. 1422).

MEYERHOF (O.). — Über die Atmung der Froschmuskulatur. (*Pflügers Arch.* (1919), t. 175, p. 20).

- Kohlehydrat und Milchsäureumsatz im Froschmuskel. (*Pflügers Arch.* (1920), t. 185, p. 11).
- Das Schnicksal der Milchsäure im der Erholungsperiode des Muskels. (*Pflügers Arch.* (1920), t. 282, p. 284).
- Über die Milchsäurebildung im der Zerschnittenen Muskulatur. (*Pflügers Arch.* (1921), t. 188, p. 114).

MEYERHOF (O.), LOHMANN (K.) et MEIER (R.). — Über die Synthese des Kohlehydrats im Muskel. (*Biochem. Zeitsch.* (1925), t. 157, p. 459).

MEYERHOF (O.). — Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt. (*Biochem. Zeitsch.* (1926), t. 178, p. 395).

- Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt. (*Biochem. Zeitsch.* (1926), t. 178, p. 462).
- Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt. (*Biochem. Zeitsch.* (1926), t. 183, p. 176).

MICHAELIS (L.) et SMITHE (C.-V.). — Influence of certain dyestuffs on fermentation and respiration. (*Journ. of Biol. Chem.* (1936), t. 113, p. 717).

PARNAS. — *Zentralbl. f. Physiol.* (1915), t. 30, p. 1.
